

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TESI DI LAUREA TRIENNALE (D. M. 207/2004)

# **STIMOLAZIONE DI COLTURE DI ASTROCITI IN VITRO CON CAMPI ELETTROMAGNETICI A RADIOFREQUENZA**

RELATORE: PROF. ALFREDO RUGGERI

CORRELATORI: PROF. STEFANO VASSANELLI, DOTT. STEFANO GIRARDI

LAUREANDO: SAMOGIN JESSICA

MATRICOLA: 614171



# INDICE GENERALE

<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Il sistema nervoso.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 I neuroni e le cellule della glia.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Gliomi.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Campi elettromagnetici e cellule.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 La risonanza quantica molecolare (RQM).....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Rexion-Age®.....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Le colture di astrociti.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Preparazione delle petri.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Settaggio del Rexion Age®.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Stimolazione delle colture.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Stimolazione per una settimana.....	23
2.4.2 Stimolazione per due settimane consecutive.....	25
<b>3 RISULTATI.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Stimolazione per una settimana.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Stimolazione per due settimane.....</b>	<b>29</b>
<b>4 CONCLUSIONI.....</b>	<b>32</b>
<b>5 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>34</b>



# 1 INTRODUZIONE

Il lavoro descritto in questa tesi si inserisce in un progetto sperimentale, avviato nell'anno accademico 2010-2011, che ha come obiettivo la verifica dell'efficacia del trattamento di gliomi mediante la stimolazione degli stessi con l'apparecchio Raxon Age®.

I precedenti lavori sono serviti a verificare l'influenza dei campi elettromagnetici variabili ad alta frequenza sul tasso di crescita delle colture di glioma umano e a identificare le condizioni ideali per le stimolazioni in termini di durata, temperatura e potenza di lavoro. La verifica degli effetti di tali trattamenti su colture primarie di astrociti viene ivi descritta.

## 1.1 Il sistema nervoso

Il sistema nervoso si divide, a livello anatomico, in: sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP).

Il SNP è formato da due parti:

- Sistema nervoso somatico, responsabile delle risposte volontarie, in quanto mette in comunicazione il SNC con i muscoli sia inviandogli gli stimoli, sia ricevendo informazioni sensoriali dagli stessi. Le fibre nervose motorie portano gli stimoli ai muscoli scheletrici, invece quelle periferiche inviano le informazioni sensitive al SNC. I neuroni motori impiegati hanno il soma collocato nella sostanza grigia del midollo spinale e la terminazione dell'assone nell'effettore, con cui comunica mediante speciali sinapsi; nelle vie afferenti, invece, i neuroni sensitivi primari portano il segnale al midollo spinale che da lì, mediante sinapsi con altri neuroni dello stesso tipo, può raggiungere parti diverse del SNC;

- Sistema nervoso autonomo, responsabile delle risposte involontarie di ghiandole e muscolatura liscia, si divide a sua volta in:
  - sistema simpatico, che risponde alle reazioni di “attacco o fuga”, ovvero prepara l’organismo all’attività fisica stimolando il cuore, dilatando i bronchi, contraendo le arterie e inibendo l’apparato digerente;
  - sistema parasimpatico, che predispone l’organismo alla digestione e all’alimentazione, al sonno e al riposo, in altre parole risponde alle reazioni di “riposo e digestione”;
  - sistema enterico, un complesso di fibre nervose che innerva i visceri.

Questo sistema è costantemente in funzione e le sue parti collaborano per mantenere ad un livello normale l’attività degli organi interni.

Il SNC si suddivide, invece, in:

- Cervello, contenuto nel cranio e formato da neuroni, o cellule nervose, e cellule della glia;
- Midollo spinale, localizzato nella colonna vertebrale.

Le due componenti fondamentali di questo sistema, presenti in entrambe le parti del SNC, sono la sostanza bianca, un insieme di fibre mieliniche, oligodendrociti, astrociti fibrosi e cellule di microglia, e la sostanza grigia, costituita da corpi cellulari di neuroni (soma), fibre mieliniche e amieliniche, astrociti protoplasmatici e cellule di microglia.

Nelle sezioni trasversali di midollo spinale si può individuare al centro la sostanza grigia, che occupa una regione ad “H”, e attorno ad essa la sostanza bianca. Nel cervello, al contrario, è la sostanza grigia, che forma la corteccia cerebrale, ad avvolgere la sostanza bianca. Data l’importanza e la delicatezza del SNC, oltre che dalle strutture ossee, è protetto anche da tre membrane di tessuto connettivo, le meningi, chiamate dura madre, aracnoide e pia madre. [1]

## 1.2 I neuroni e le cellule della glia

Nel cervello si possono distinguere due tipi di cellule: i neuroni, che hanno il compito di ricevere e trasmettere gli impulsi nervosi da e verso il SNC, e le cellule della glia, che svolgono funzioni di supporto funzionale e strutturale, di protezione e metaboliche rispetto ai neuroni.

Nei neuroni sono identificabili tre zone: il soma, contenente il nucleo e tutti gli organuli deputati al metabolismo cellulare, i dendriti, brevi terminazioni molto ramificate che ricevono gli impulsi elettrici sotto forma di neurotrasmettitori di origine chimica o flussi di ioni, e l'assone, lungo prolungamento del soma ricoperto da una guaina mielinica, attraverso il quale avviene la comunicazione con altri neuroni in corrispondenza del soma, dei dendriti o dell'assone. Le membrane presinaptica/postsinaptica e la giunzione intersinaptica individuano una sinapsi, ovvero la regione in cui lo stimolo elettrico passa da un neurone a una cellula effettrice. La prima membrana (presinaptica) libera un neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, questo si lega ai recettori della seconda membrana e causa l'apertura dei canali ionici, attraverso cui passano ioni che ne modificano la permeabilità e il potenziale di membrana. In relazione alla variazione della polarizzazione della membrana postsinaptica si possono avere sia potenziali postsinaptici eccitatori (depolarizzazione) che inibitori (aumento della polarizzazione). Durante la comunicazione avviene, quindi, la trasformazione dell'impulso elettrico in chimico, e viceversa.

Le cellule della glia, o nevroglia, sono circa 10 volte i neuroni, conservano anche dopo lo sviluppo la capacità di riprodursi per mitosi e svolgono funzioni diverse in base alla loro posizione nel sistema nervoso. Si dividono in microglia e macroglia.

### **Cellule di Schwann (SNP)**

Ogni cellula, appiattita e con nucleo piatto, avvolge più volte un tratto di assone, formando la guaina mielinica e il neurilemma dei neuroni del SNP, e svolge un'attività fagocitaria e di pulizia dei residui cellulari.

### **Cellule satellite (SNP)**

Sono piccole cellule che delimitano la superficie esterna del soma dei neuroni del SNP.

### **Microglia (SNC)**

È costituita da macrofagi specializzati nella fagocitosi, con corpo cellulare piccolo, nucleo oblungo e brevi prolungamenti ramificati, costantemente in movimento nel tessuto e in grado di aumentare notevolmente il loro numero in caso di lesioni al cervello. Per il ruolo di supporto ai neuroni viene classificata come nevroglia, nonostante i macrofagi derivino da monociti anziché dal tessuto ectodermico del tubo neurale, come le altre cellule della glia.

### **Cellule ependimali (SNC)**

Delimitano le cavità del SNC e favoriscono il movimento del liquido cerebrospinale grazie al battito delle ciglia di cui sono dotate. Sembra siano coinvolte nella rigenerazione del tessuto nervoso, con funzioni analoghe alle cellule staminali.

### **Oligodendrociti (SNC)**

Simili ai dendrociti, hanno meno estroflessioni e più piccole. Gli oligodendrociti presenti nella sostanza grigia (oligodendrociti satelliti) sono adiacenti ai corpi cellulari e svolgono funzioni metaboliche di supporto, quelli presenti nella sostanza bianca (oligodendrociti interfascicolari) ricoprono gli assoni con la mielina, una sostanza lipidica che isola il neurone e favorisce la propagazione del segnale elettrico. La guaina mielinica che si forma differisce da quella del SNP nel fatto che più di un assone può essere rivestito dalla stessa cellula, poiché gli oligodendrociti hanno numerosi prolungamenti, in entrambi i casi, tuttavia, la guaina viene interrotta a tratti regolari dai nodi di Ranvier, che permettono lo scambio di ioni sodio e potassio così da rendere la propagazione dell'impulso più veloce, infatti non percorre tutto l'assone, ma salta da un nodo all'altro.

### **Precursori degli oligodendrociti (SNC)**

Di queste cellule si sa per certo che sono le più numerose tra quelle soggette a mitosi nel cervello adulto, creano sinapsi con i neuroni, hanno proprietà diverse dagli astrociti, dagli oligodendrociti e dalla microglia, ma la loro funzione precisa non

è ancora stata scoperta, se non per il ruolo di precursori degli oligodendrociti durante la fase di sviluppo del tessuto nervoso.

### **Glia radiali (SNC)**

Forniscono il supporto per la migrazione verso l'esterno delle cellule corticali durante lo sviluppo del sistema nervoso. Nel cervello adulto sono presenti particolari glia radiali nel cervelletto e nella retina, con funzioni (regolazione della plasticità sinaptica e agevolazione della comunicazione bidirezionale con i neuroni) e nomi (Glia di Bergmann e Cellule di Müller) diversi.[4]

### **Astrociti (SNC)**

Sono le cellule più numerose tra le nevroglia, hanno una struttura caratterizzata da numerose espansioni, che ricorda la forma a stella, e si dividono in due categorie:

1. Astrociti protoplasmatici: presenti nella sostanza grigia, le numerose estroflessioni sono corte e ramificate;
2. Astrociti fibrosi: presenti nella sostanza bianca, i loro prolungamenti citoplasmatici sono lunghi e sottili.

Come per tante altre componenti dell'organismo umano, è importante il modo in cui queste comunicano tra loro. Nel caso degli astrociti ciò avviene mediante il fenomeno chiamato "onda di calcio": la sinapsi elettrica tra cellule permette la diffusione della molecola messaggero IP3 (Inositolo trifosfato), che attiva i canali calcio degli organuli cellulari con conseguente rilascio nel citoplasma della sostanza, che a sua volta può stimolare la produzione di ulteriore IP3 per un rilascio maggiore di ioni calcio. Le funzioni di queste cellule sono svariate, non tutte ancora completamente comprese, ed includono:

- Regolazione dell'ambiente chimico circostante i neuroni mediante rimozione degli ioni (potassio, calcio, sodio, molecole di glutammato) e riciclaggio dei neurotrasmettitori usati durante la trasmissione sinaptica. Recentemente sono stati eseguiti studi volti a verificare il ruolo degli astrociti nella regolazione della concentrazione di potassio nell'ambiente circostante i neuroni: i livelli, che aumentano in conseguenza a un impulso nervoso, oltre a essere riportati a valori normali, sembra possano venire regolati per

fermare la comunicazione tra neuroni, come se venisse lanciato un segnale di stop, con effetto analogo al rilascio del neurotrasmettitore inibitorio GABA;[2]

- Riserva di ATP, e quindi di energia, per il funzionamento dei neuroni: la presenza di neurotrasmettitori, che indica attività sinaptica, viene recepita anche dagli astrociti, nei quali induce la glicogenolisi immediata e successivamente la sintesi di glicogeno per ristabilirne i livelli normali. La loro riserva di glucosio è modesta, difatti questo viene assorbito dal flusso ematico in corrispondenza del rilascio di glutammato da parte dei neuroni, viene immagazzinato, trasformato in lattato per poter poi essere utilizzato sia dai neuroni che dagli astrociti;[3]
- Regolazione della vasocostrizione/dilatazione mediante il rilascio di sostanze (acido arachidonico) i cui metaboliti sono vasoattivi;
- Agevolazione della migrazione dei neuroni durante lo sviluppo cerebrale e produzione di fattori di crescita per gli stessi;
- Agevolazione dello scambio di ioni tra sangue e cervello: uno strato continuo di cellule endoteliali costituisce la barriera ematoencefalica attorno ai vasi sanguigni del SNC, il cui scopo è quello di impedire o rallentare il passaggio attraverso la membrana alla maggior parte delle sostanze presenti nel sangue (grosse molecole, molecole non liposolubili, con elevata carica elettrica) al fine di evitare la diffusione di sostanze potenzialmente dannose od ormoni e neurotrasmettitori liberati per agire in altre parti del corpo. Gli astrociti sono connessi alla barriera, prelevano ciò che ne passa attraverso per poi distribuirlo principalmente ai neuroni.[4]

### 1.3 Gliomi

Per le neoplasie del SNC vengono fatte due classificazioni principali: anzitutto si distingue tra tumori primari, che si originano nel parenchima encefalico e nei suoi involucri, e tumori secondari, che hanno origine in altri organi del corpo e le

metastasi raggiungono il cervello; quindi si distinguono i tumori gliali da quelli non gliali.

Per quanto concerne i tumori gliali, o gliomi, essi hanno origine da mutazioni neoplastiche delle cellule della glia, costituiscono circa il 40% delle neoplasie del SNC, e le principali forme sono: astrocitomi (rappresentano il 75% dei gliomi), oligodendrogliomi ed ependimomi, derivanti rispettivamente da astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali.

Una successiva distinzione viene fatta tra gliomi circoscritti e gliomi diffusi: i primi hanno una bassa capacità infiltrativa nel tessuto circostante e sono piuttosto rari (astrocitoma pilocitico, xantoastrocitoma pleomorfo, astrocitoma subependimale a cellule giganti), i secondi, invece, sono più comuni e hanno una buona capacità di diffusione nella sostanza bianca (astrocitoma diffuso, astrocitoma anaplastico, glioblastoma).

Per indicare il livello di malignità viene utilizzato un sistema di gradazione, proposto dalla *World Health Organization* (WHO) nel 1993, basato su quattro parametri (proliferazione endoteliale, necrosi, aumentata cellularità, presenza di mitosi) e comprendente quattro livelli di gravità, con il quale un glioma di livello I o II viene detto di basso grado, invece uno di livello III o IV, molto più pericoloso, è detto di alto grado. L'età del malato e l'area sede della neoplasia influenzano il livello di gravità, ad esempio tumori al cervello negli adulti sono più facilmente di alto grado rispetto quelli in pazienti giovani, se non bambini, così come sono tendenzialmente maligni tumori situati negli emisferi cerebrali, al contrario quelli nel midollo spinale.

## **Ependimomi**

- Ependimomi di basso grado

Possono presentarsi a qualunque età con due picchi caratteristici tra 0-10 anni, in cui la neoplasia si sviluppa nelle aree cerebrali, e tra 40-50 anni, con origine nelle cellule spinali. Sono abbastanza rari e le terapie che sembrano avere maggiore successo sono la chemioterapia basata sul platino e, ove possibile, la rimozione chirurgica.

- Ependimomi anaplastici (di alto grado)

Rappresentano il 25% degli ependimomi intracranici, hanno uno sviluppo analogo al tipo precedente, ma decisamente accelerato, e si sa poco sui processi che portano alla loro formazione, così come non è stato ancora individuato un trattamento efficace.

## **Oligodendrogliomi**

- Oligodendrogliomi di basso grado

Sono poco comuni in quanto rappresentano circa il 10-15% dei tumori gliali, ma sono eccezionalmente sensibili alla chemioterapia. La peculiarità, che ne permette poi la diagnosi, è la perdita di eterozigosi dei cromosomi 1p e 19q, ovvero la perdita di funzionalità dei due alleli.

- Oligoastrocitomi di basso grado

Sono neoplasie miste in quanto interessano sia gli oligodendrociti che gli astrociti. Hanno una sopravvivenza media minore, intermedia tra quella dell'oligodendroglioma e quella dell'astrocitoma, pur trattandosi di tumori di basso grado.

- Oligodendrogliomi e oligoastrocitomi anaplastici

La sopravvivenza media è notevolmente ridotta rispetto ai corrispettivi di basso grado e il trattamento apparentemente più efficace consiste nell'escissione chirurgica e successivo trattamento radioterapico, nonostante la sensibilità alla chemioterapia.

## **Astrocitomi**

- Astrocitomi di basso grado

Sono poco frequenti, in genere benigni, specialmente se il paziente è giovane, e hanno un decorso lento, anche se si è notata la tendenza ad evolvere in lesioni maggiormente anaplastiche. I più comuni sono l'astrocitoma diffuso di grado II e gli astrocitomi circoscritti. Il trattamento principale prevede la rimozione e successivamente la radioterapia.

- Astrocitomi di alto grado

I più comuni sono il glioblastoma, la *gliomatosis cerebri* e l'astrocitoma anaplastico. L'astrocitoma anaplastico si distingue dagli astrocitomi di basso grado per la presenza di mitosi, affligge in media uomini di circa 45 anni e ha un'elevata propensione a peggiorare, fino a diventare un glioblastoma, con sopravvivenza media di uno o due anni. La cura più utilizzata prevede la rimozione della maggior parte possibile di lesione unitamente alla radioterapia; la chemioterapia sembra, invece, rivelarsi efficace in caso di recidiva.

## 1.4 Campi elettromagnetici e cellule

Le interazioni tra campi elettromagnetici (CEM) e sistemi biologici sono state e sono tutt'ora oggetto di studi poiché, con il passare dei decenni, ai campi naturali in cui si è sviluppata la vita, si sono andati a sovrapporre un'infinità di campi "artificiali" causati dai vari apparecchi prodotti dall'uomo. Nonostante i campi magnetici ed elettrici siano strettamente collegati, come descritto dalle equazioni di Maxwell, ci si preoccupa soprattutto per i primi, che non possono essere schermati e vengono generati solo da apparecchi in funzione, a differenza dei secondi, schermabili e generati da qualsiasi strumento collegato all'alimentazione.

Lo spettro delle frequenze delle onde elettromagnetiche è diviso in due parti: radiazioni ionizzanti, fino a  $3 \times 10^{15}$  Hz, in corrispondenza degli ultravioletti, e radiazioni non ionizzanti. Del primo gruppo fanno parte i raggi X e  $\gamma$ , che possiedono una lunghezza d'onda comparabile con le dimensioni molecolari e un'energia tale da rompere i legami della materia, ovvero riescono a ionizzare molecole o atomi. Il secondo tipo, invece, è caratterizzato da un livello d'energia insufficiente a causare la ionizzazione, ma abbastanza elevato da indurre modifiche termiche, meccaniche o bioelettriche alla materia. Tra queste si distingue in ELF (*Extremely Low Frequency*), onde a bassa frequenza, inferiore a 300Hz, e RF (Radio Frequenze) e MW (*Micro Wave*), comprese tra 300KHz e 300GHz.

Gli effetti dei CEM dipendono dall'intensità, dalla frequenza e dalla durata e si suddividono in effetti termici, causati da un innalzamento della temperatura del sistema per cessione di energia da parte del CEM, su cui ci si è concentrati in modo prevalente in passato, ed effetti specifici o non termici, caratterizzati da disturbi di

vario tipo; si possono avere anche effetti cronici, dovuti a una esposizione di bassa intensità per lungo periodo, di cui si hanno informazioni scarse, o effetti acuti, legati a una esposizione di media-alta intensità per un breve periodo.[5]

In generale un sistema biologico sottoposto a un campo elettromagnetico reagisce in diversi modi, ad esempio le particelle cariche presenti, quali possono essere ioni, radicali, strutture dipolari, risentono della forza elettromotrice (f.e.m.) indotta dalla componente magnetica e si muovono di conseguenza; vengono modulati gli effetti di ormoni, neurotrasmettitori e di una vasta gamma di processi calcio-dipendenti, per cui si modifica il metabolismo di alcuni tipi cellulari (osteoblasti, fibroblasti, condrociti, cellule nervose); vengono modificate proliferazione, trascrizione, sintesi e secrezione di fattori di crescita.

I meccanismi di interazione dei campi ELF con l'organismo non sono ancora del tutto chiari, tuttavia i numerosi studi epidemiologici condotti, specialmente per frequenze di rete, ovvero 50/60Hz, hanno portato alla conclusione che gli effetti termici sono trascurabili e anche quelli acuti sono riconducibili a quelli specifici (bruciature, fibrillazione ventricolare, sensazione visiva di luce tremolante, stimolazione del tessuto nervoso), inoltre non sembra siano significativamente legati all'insorgere di alcun tipo di neoplasie, nemmeno alle leucemie infantili di cui, per lungo tempo, si è pensato potessero essere una origine. Sui campi MW e RF si hanno maggiori conoscenze, infatti è noto che causano principalmente effetti termici acuti, dovuti all'eccitazione delle molecole d'acqua presenti nel corpo (dipoli elettrici), e che cedono energia sotto forma di perdite dielettriche e di conduzione: si rileva una variazione nella costante dielettrica  $\epsilon$  e nella conducibilità  $\sigma$  del tessuto/organo irradiato e un aumento di temperatura dello stesso e delle zone circostanti. I pochi lavori svolti, che in generale hanno ricercato una relazione tra il CEM e l'insorgenza di alcuni tipi di tumore, variazioni nel tracciato EEG, nell'attività di alcuni neurotrasmettitori, nella pressione arteriosa e nell'attività della membrana cellulare, non sono giunti a conclusioni significative. Le difficoltà nello svolgere questi studi sono dovute all'ampia gamma di frequenze considerate, alla varietà nei modi di emissione e di esposizione, alla non omogeneità o significatività dei protocolli adottati, all'eterogeneità degli effetti ricercati e alla scarsa potenza statistica dei dati raccolti: tutto ciò, unitamente ai risultati ottenuti con esperimenti in laboratorio, ha

portato la WHO a dichiarare, nel 2012, che non ci sono prove sufficienti e convincenti per affermare che questi campi (ELF, RF, MW) accorcino la durata della vita umana o promuovano la nascita di neoplasie. [6][7][8][9][10][11][12][13]

Negli ultimi anni, grazie anche alle maggiori conoscenze sull'argomento, i CEM sono stati introdotti in medicina come strumenti alternativi per la diagnosi (onde radio, risonanza magnetica[14], magnetoterapia[15]) e la terapia (studi hanno dimostrato che campi ELF stimolano la proliferazione di osteoblasti in vitro, si ipotizza di ottenere lo stesso effetto anche in vivo, specialmente nei primi giorni di cura) e a tal proposito sono stati sviluppati dispositivi che, basandosi su principi quali quello della risonanza quantica molecolare, utilizzano onde a frequenze specifiche tali da indurre gli effetti desiderati, e non nocivi, sui pazienti.

## **1.5 La risonanza quantica molecolare (RQM)**

La teoria della risonanza quantica molecolare prende spunto da due osservazioni fondamentali:

- per ogni tipo di legame esiste un valore di energia che lo porta alla rottura senza aumento di temperatura;
- l'energia trasferita da una sorgente all'utilizzatore può essere scomposta in quanti, ovvero in pacchetti discreti, il cui valore dipende dalla frequenza, nel caso dei fotoni secondo  $E=h \cdot f$ , con  $h$  costante di Planck ( $\approx 6,626 \times 10^{-34}$  Js) e  $f$  frequenza del segnale;

da ciò ne deriva che se il legame molecolare è stimolato da un'onda la cui energia quantica è pari a quella molecolare di legame, allora questo si spezza senza oscillare, quindi non si ha aumento di energia cinetica né innalzamento della temperatura, viceversa, se i quanti hanno un valore diverso, maggiore o minore, il legame oscilla liberando calore fino alla rottura.

Per i tessuti biologici il trasferimento di energia viene effettuato mediante corrente alternata ad alta frequenza e bassa intensità, in questo modo i quanti, definiti Q-gamma, vengono portati dagli elettroni. La scelta di questi portatori è dettata dal

fatto che l'interazione avviene solo con una particolare lunghezza d'onda, confrontabile con le dimensioni della molecola: se venissero usati dei fotoni per il trasporto dell'energia, ci si ritroverebbe con lunghezze d'onda molto piccole ( $\lambda=c/f$ ,  $c$  velocità della luce), invece per gli elettroni tale valore è pari a  $\lambda=h/m \cdot v$ , quindi è legato alla loro quantità di moto, ovvero alla velocità, facilmente regolabile agendo sul valore della tensione del campo elettrico applicato; inoltre sono precisi nel colpire il bersaglio e, a una data frequenza, l'energia a loro associata è maggiore di quella del corrispondente fotone poiché dispongono di una massa che va ad aumentare il valore del Q-gamma.[16]

Considerando che ad ogni legame molecolare è associato un particolare valore di energia, per poterne stimolare o scindere un maggiore numero viene utilizzato un *range* di frequenze ampio, in questo modo, combinando opportunamente le onde che compongono il segnale, ognuna con l'ampiezza in relazione alla frequenza, si può disporre di tanti valori diversi per i quanti.

Nel caso della semplice stimolazione, quindi con uno spettro più ampio, si è osservato che le molecole si allontanano, per poi riavvicinarsi, senza infrangersi e mediante vari studi si è arrivati a capire che la risposta delle cellule a una stimolazione con campo elettrico variabile ad alta frequenza è di tre tipi:

1. attivazione del metabolismo in conseguenza alla deformazione della membrana cellulare: lo spegnimento/accensione del campo elettrico provoca la de/contrazione della zona della cellula più vicina al campo, in cui si attivano le proteine di membrana sensibili alle deformazioni di tipo meccanico;
2. modificazione del potenziale di membrana: la stimolazione induce una depolarizzazione della membrana cellulare;
3. rilascio di ioni calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico: un aumento della concentrazione di questi ioni nel citoplasma indica un aumento dell'attività metabolica calcio-dipendente;

inoltre, fatto importante, non viene indotta apoptosi.[17]

## 1.6 Rexion-Age®

A Quinto Vicentino ha sede la Telea Electronic Engineering S.r.l., un'azienda che opera nel settore biomedicale fin dal 1988 e che si è distinta per la produzione di dispositivi medico-chirurgici, quali la gamma di bisturi Vesalius® e il Rexion Age®, basati sul principio, da loro scoperto e brevettato, della risonanza quantica molecolare.

Il primo strumento, il Vesalius®, è, come dice il nome, un elettrobisturi capace di operare sia il taglio freddo che la coagulazione, anche in contemporanea, dei tessuti contenendo notevolmente l'innalzamento della temperatura nella zona trattata, riducendo considerevolmente il conseguente danno termico, preservando quindi le strutture nelle zone limitrofe, accelerando il processo di guarigione e portando numerosi altri effetti positivi in sede operatoria e nelle fasi successive. Questo vantaggio, non ottenibile con i comuni elettrobisturi, è dovuto al fatto che il campo di frequenze di lavoro, tra i 4MHz e i 16MHz, è tale da trasferire al tessuto l'energia prevalentemente in forma di energia potenziale, mediante la rottura dei legami molecolari e la deformazione della struttura quaternaria del fibrinogeno, che innesca le reazioni della cascata coagulativa, e solo una minima parte di energia termica, insufficiente a indurre necrosi termica nella zona circostante l'incisione (quindi temperature inferiori a 50°C e pari a 63°C nel caso della coagulazione).[18]

Il Rexion Age®, invece, è un dispositivo che attualmente viene utilizzato prevalentemente in medicina estetica e nelle terapie antalgiche, ovvero nelle cure del dolore. Il principio su cui si basa il funzionamento di questo strumento è, in maniera analoga al bisturi, quello di trasferire al tessuto una corrente che ha uno spettro di frequenze ampio (4MHz-64MHz) e a bassa densità di energia, il cui scopo è quello di eccitare i legami molecolari in modo da attivare il metabolismo cellulare e **stimolare la rigenerazione anziché la riparazione cellulare**, così che la parte danneggiata non venga sostituita da tessuto cicatriziale "morto", ma da tessuto analogo a quello originale, con le stesse caratteristiche e le stesse funzionalità, ottenuto mediante replicazione di cellule staminali adulte. A tutto ciò si aggiunge il mancato trasferimento di calore per effetto Joule, che permette di mantenere,

anche in questo caso, la temperatura nella zona trattata a valori non elevati, attorno ai 42°C-43°C.[19]

Sul breve termine si assiste a una riduzione delle infiammazioni, sul medio termine all'effettiva rigenerazione cellulare.

Il doppio effetto dato dall'utilizzo del dispositivo viene sfruttato nei due ambiti di applicazione: a livello di chirurgia estetica, l'aumento del metabolismo corrisponde a una maggiore produzione di collagene ed elastina, che porta a un ispessimento e rassodamento del derma, ovvero a un effetto visivo di ringiovanimento coerente con la fisionomia del paziente; si possono ottenere risultati notevoli anche nella riduzione della cellulite e nella cura degli inestetismi dell'acne. Dall'altra parte numerosi studi clinici riportano l'effetto antinfiammatorio del Rexion Age® nel trattamento del dolore cronico e non, degli edemi post traumatici (Sindrome di Haglund, artrosi, lesioni muscolari e traumatiche, edema post-chirurgico) e nella ripresa della funzionalità articolare dopo interventi di artroprotesi, casi in cui vengono interessati tessuti muscolari, cartilaginei e derma. Da notare è l'assenza di effetti collaterali e di recidive in tutti i casi esaminati. Infine si stanno svolgendo delle ricerche che prevedono l'utilizzo di questo strumento sia su colture cellulari di gliomi sia su modelli murini affetti da Alzheimer per verificare se in futuro, nei modi opportuni, potrà essere utilizzato con successo anche nella cura di queste malattie. [20][21]

Lo strumento modificato presente nel laboratorio è costituito da:

- un generatore che fornisce una corrente monopolare a frequenza variabile in un *range* prefissato e a bassa intensità;
- un canale d'uscita;
- una coppia di elettrodi circolari metallici adatti alla stimolazione di petri;
- una piastra neutra per la chiusura della corrente in ogni ambiente d'utilizzo;
- uno schermo *touch* per impostare i vari parametri, quali possono essere durata del trattamento e potenza erogata.



*-Rexon Age® presente nel laboratorio-*

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Le colture di astrociti

Per le varie stimolazioni sono stati utilizzati astrociti primari di ratto postnatale. Le cellule prelevate in tale momento sono state utilizzate per l'intero ciclo di sperimentazioni, mantenute in delle fiasche con un terreno di coltura adatto alla loro crescita e conservate in incubatore a temperatura controllata di 36.5°C, CO<sub>2</sub> al 5% e umidità controllata.

Il terreno di coltura in cui vengono immerse le cellule contiene:

- D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, addizionato di L-glutammina (Invitrogen-Gibco))
- FBS 10% (*Foetal Bovine Serum* contenente anche ormoni, fattori di crescita, colesterolo, acidi grassi, proteine plasmatiche (Invitrogen-Gibco))
- antibiotici (Penicillina 10 u/ml e Streptomicina 10 µg /ml (Invitrogen-Gibco))
- indicatore di pH

Il D-MEM contiene amminoacidi, vitamine, sali minerali e zuccheri in acqua, gli si aggiunge il siero bovino, per fornire alla coltura i fattori di crescita e le proteine plasmatiche necessarie al corretto sostentamento delle cellule, e gli antibiotici, per evitare la contaminazione delle petri da parte di microrganismi. L'indicatore di pH serve a rendere visibili condizioni di sofferenza delle cellule dovute, ad esempio, a contaminazione o sovraffollamento.

### 2.2 Preparazione delle petri

La stimolazione inizia il lunedì, tuttavia il venerdì della settimana precedente si preparano le coppie di petri che dovranno essere utilizzate, prelevando parte delle cellule coltivate nelle fiasche e trattandole come segue:

1. Creazione del rivestimento proteico sul fondo delle petri: in ognuna viene messo 1ml di poli-L-lisina (PLL) 10 µg /ml, una proteina carica positivamente

che favorisce l'adesione cellulare poiché ha funzioni strutturali analoghe alla matrice extracellulare;

2. Lavaggio e asciugatura delle petri: dopo un tempo pari o superiore a 5 minuti la PLL viene aspirata e si lasciano le petri ad asciugare senza il coperchio;
3. Eliminazione terreno di coltura dalla fiasca: si aspira il terreno di coltura e si risciacqua delicatamente con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a pH neutro per eliminarne ogni traccia di siero, così da favorire il passaggio successivo;
4. Lavaggio con tripsina: riscaldato l'enzima a 37°C per attivarlo, lo si inserisce nella fiasca, si mette in incubatore per 1 minuto, quindi, mediante dei leggeri colpi al contenitore, si agevola il distacco degli astrociti. La tripsina serve a tagliare i legami che le cellule creano per ancorarsi al supporto, ma non può essere lasciata agire per un tempo troppo lungo in quanto tende ad attaccare anche la membrana cellulare, quindi, per inibirla, viene aggiunto del terreno di coltura in cui il siero bovino blocca l'enzima;
5. Centrifugazione: la sospensione di astrociti e terreno di coltura viene centrifugata in modo da separarne i componenti in un precipitato costituito dalle cellule ed un surnatante costituito dal terreno contenente cellule morte e detriti;
6. Separazione delle cellule: per evitare di avere nelle petri astrociti a gruppi si risospendono le cellule mediante dissociazione meccanica con una micro pipetta;
7. Conta delle cellule per ml: utilizzando una camera di Bürker si contano le cellule presenti in una goccia e si fa la conversione per ottenere il numero di cellule per ml: se non è stato svolto accuratamente il passaggio precedente il numero che si ottiene è falsato;
8. Distribuzione delle cellule nelle petri: dato il numero di petri che si devono preparare e il numero di cellule per ml, si determina quanta soluzione deve essere messa in ogni petri per avere, approssimativamente, 3000 astrociti in ognuna.

Tutte le operazioni, tranne il punto numero 5, vengono effettuate sotto cappa sterile a flusso laminare verticale. I tre giorni di riposo intermedi servono alle cellule per riprendersi dallo stress dovuto alle operazioni appena descritte.

### **2.3 Settaggio del Rexon Age®**

L'apparecchio è stato modificato per l'uso in laboratorio principalmente sostituendo un solo canale d'uscita ai comuni cinque, fornendo degli elettrodi circolari adattati per la stimolazione delle petri, che permettono una stimolazione uniforme, e una piastra neutra per la sicurezza dell'operatore.

Sulla base delle prove precedenti sono stati impostati i due parametri variabili: la durata di ogni seduta pari a 600s e la potenza a 50, corrispondente ai valori efficaci di potenza, 6,56W, di corrente, 0,072A, e di tensione, 91,1V.

Dai tecnici:

- Tensione di alimentazione: 230 V
- Frequenza di alimentazione: 50/60 Hz
- Potenza massima assorbita dalla rete: 250 VA
- Potenza massima di uscita: 40 W/ 1500  $\Omega$
- Frequenza in uscita: spettro in frequenza da 4 a 64 MHz (brevettato da Telea Electronic Engineering S.r.l.)
- Grado di protezione contro ingressi di liquidi: IPX0



-Display del Rexon Age® pronto per la stimolazione-

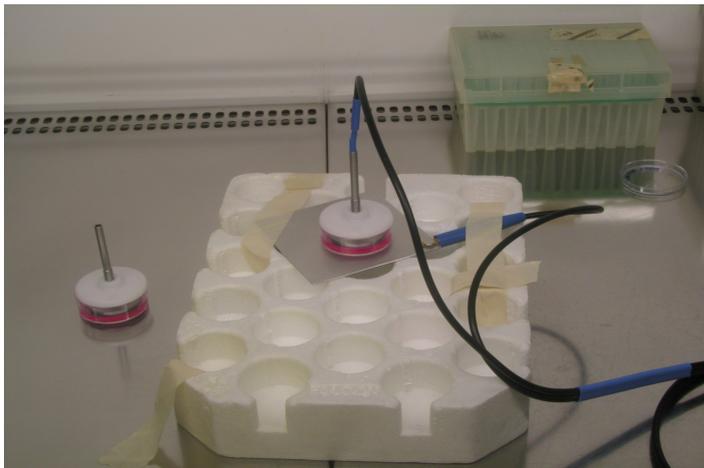
## 2.4 Stimolazione delle colture

L'obiettivo delle prove svolte è quello di determinare se e come una stimolazione mediante correnti a radiofrequenza e bassa intensità influenza il tasso di crescita di colture di astrociti in vitro. Per ottenere i risultati cercati sono stati svolti due tipi di test, proceduralmente analoghi, ma diversi in termini di durata del trattamento.

### 2.4.1 Stimolazione per una settimana

Al fine d'individuare una variazione nei tassi di crescita le petri a disposizione sono state divise in coppie: una è stata definita controllo (C), e quindi non è stata collegata al Rexon Age®, e l'altra trattata (T). Per poter calcolare i suddetti tassi di crescita, per ogni petri sono state prese 8 foto in posizioni casuali al lunedì e altrettante, nello stesso ordine e posizione, al venerdì, così da confrontare la stessa zona all'inizio della settimana e alla fine. Mediante un microscopio *Nikon Eclipse 80i* cui è stata collegata una fotocamera con un CCD da 1Mpx sono state prese le immagini in campo chiaro con ingrandimento 4x, successivamente si è provveduto a migliorarne la qualità, in particolare luminosità e contrasto, grazie al programma ImageJ, quindi ne è stata effettuata la conta manuale, in cui si è scelto di escludere le cellule che apparivano di forma circolare, poiché il loro stato di salute non era chiaramente definibile come ottimale.

Nei giorni compresi tra il lunedì e il giovedì sono state effettuate le stimolazioni: tolte dall'incubatore due petri alla volta, appartenenti alla stessa coppia C-T, sono state posizionate sotto la cappa e vi è stato inserito l'elettrodo, prestando attenzione che la sua superficie fosse bene a contatto con il terreno di coltura, senza, tuttavia, esservi immerso. La petri trattata, a differenza del suo controllo, è stata collegata allo strumento e posta sopra la piastra neutra, così da garantire le condizioni di sicurezza. Finito il trattamento la coppia è stata riposta in incubatore.



*-Petri durante la stimolazione. A destra c'è il trattato, a sinistra il controllo-*

In questo primo tipo di test, dati i conteggi delle cellule prima e dopo il trattamento, vengono valutati, per il gruppo di controllo e per quello trattato:

1. *Tasso di crescita (T%)*: lo si calcola per ogni petri considerando il numero totale di cellule presenti il lunedì ( $n_{\text{lun}}$ ) e il venerdì ( $n_{\text{ven}}$ ), quindi si fa la media dei risultati ottenuti

$$T\% = [(n_{\text{ven}} - n_{\text{lun}})/n_{\text{lun}}] \cdot 100$$

2. *Standard deviation del tasso di crescita (SD)*: partendo dai  $T_i$  di ogni petri se ne calcola la deviazione standard, ovvero quanto i singoli valori si discostano dalla media (vedi punto precedente)
3. *SEM*: definito N il numero totale di immagini prese un dato giorno per un gruppo, l'errore standard di misura si ottiene dividendo la SD per la radice quadrata di N e rappresenta l'attendibilità della misura

$$N = (8 \cdot \text{numero petri tot})/2$$

$$SEM = SD / \sqrt{N}$$

Protocollo sperimentale:

1. si prelevano le petri a coppie dall'incubatore;
2. si numera la coppia, si individuano gli otto campi da fotografare e si definisce quale sarà C e quale T;
3. si prendono le immagini di ogni campo in ogni petri;
4. si sottopone la coppia alla stimolazione (nel caso, dieci minuti a potenza nominale di 50) e la si ripone in incubatore, per quattro giorni consecutivi;
5. al terzo giorno si rinfresca la coltura;
6. il quinto giorno si fanno le foto di fine settimana.

È importante che le petri di ogni coppia vengano maneggiate sempre assieme e che in entrambe venga inserito l'elettrodo per ridurre al minimo i fattori di diversità che potrebbero falsare i risultati.

#### **2.4.2 Stimolazione per due settimane consecutive**

Questo test prevede di utilizzare lo stesso gruppo di petri per due settimane consecutive, per un totale di 8 giorni di stimolazione effettiva e 4 gruppi di immagini, prese il primo, il quinto, l'ottavo e il dodicesimo giorno. Gli strumenti e le procedure per acquisire le foto e per stimolare le colture sono del tutto analoghe al test precedente, con l'unica accortezza, il quinto giorno, di riporre le petri nell'incubatore, anziché smaltirle, per poterle poi usare la settimana successiva. Per completezza, nel seguito viene riportato il protocollo sperimentale.

I valori ricercati sono, anche in questo caso:

1. *Tasso di crescita*: lo si calcola per ogni petri considerando il numero totale di cellule presenti il lunedì ( $n_{lun}$ ) e il venerdì ( $n_{ven}$ ), quindi si fa la media dei risultati ottenuti

$$T_{sett1}\% = [(n_{ven1} - n_{lun1})/n_{lun1}] \cdot 100$$

$$T_{sett2}\% = [(n_{ven2} - n_{lun2})/n_{lun2}] \cdot 100$$

Inoltre si calcola il tasso di crescita relativo alle due settimane consecutive, utilizzando le conte cellulari del primo lunedì e del secondo venerdì

$$T\% = [(n_{\text{ven2}} - n_{\text{lun1}})/n_{\text{lun1}}] \cdot 100$$

2. *Standard deviation del tasso di crescita (SD)*

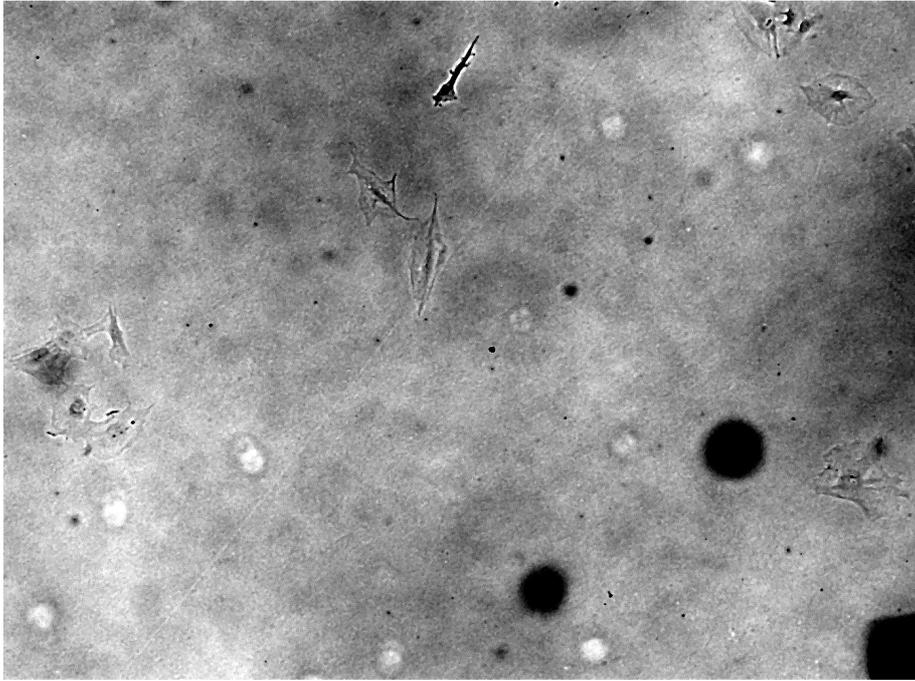
3. *SEM*

i cui significati e le cui formule sono descritti nel paragrafo 2.4.1.

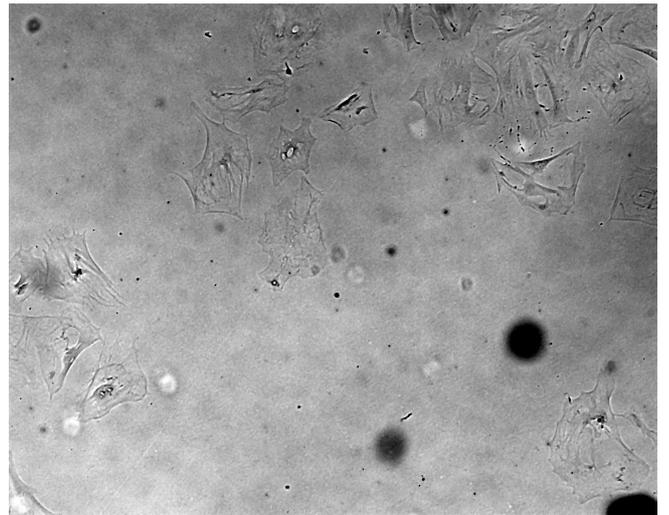
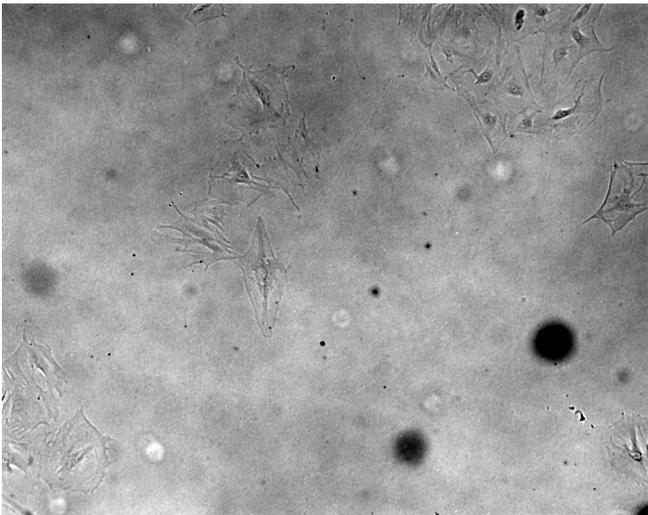
Protocollo sperimentale:

1. si prelevano le petri a coppie dall'incubatore;
2. si numera la coppia, si individuano gli otto campi da fotografare e si definisce quale sarà C e quale T;
3. si prendono le immagini di ogni campo in ogni petri;
4. si sottopone la coppia alla stimolazione (nel caso, dieci minuti a potenza nominale di 50) e la si ripone in incubatore, per quattro giorni consecutivi;
5. al terzo giorno si rinfresca la coltura;
6. il quinto giorno si fanno le foto di fine settimana e si ripongono le petri nell'incubatore;
7. l'ottavo giorno si prelevano le petri a coppie dall'incubatore;
8. si prendono le immagini di ogni campo in ogni petri;
9. si sottopone la coppia alla stimolazione e la si ripone in incubatore, per quattro giorni consecutivi;
10. al nono/decimo giorno si rinfresca la coltura;
11. il dodicesimo giorno si fanno le foto di fine settimana.

È importante che le petri di ogni coppia vengano maneggiate sempre assieme e che in entrambe venga inserito l'elettrodo per ridurre al minimo i fattori di diversità che potrebbero falsare i risultati.



*-Lunedì della prima settimana, campo1, petri C-*



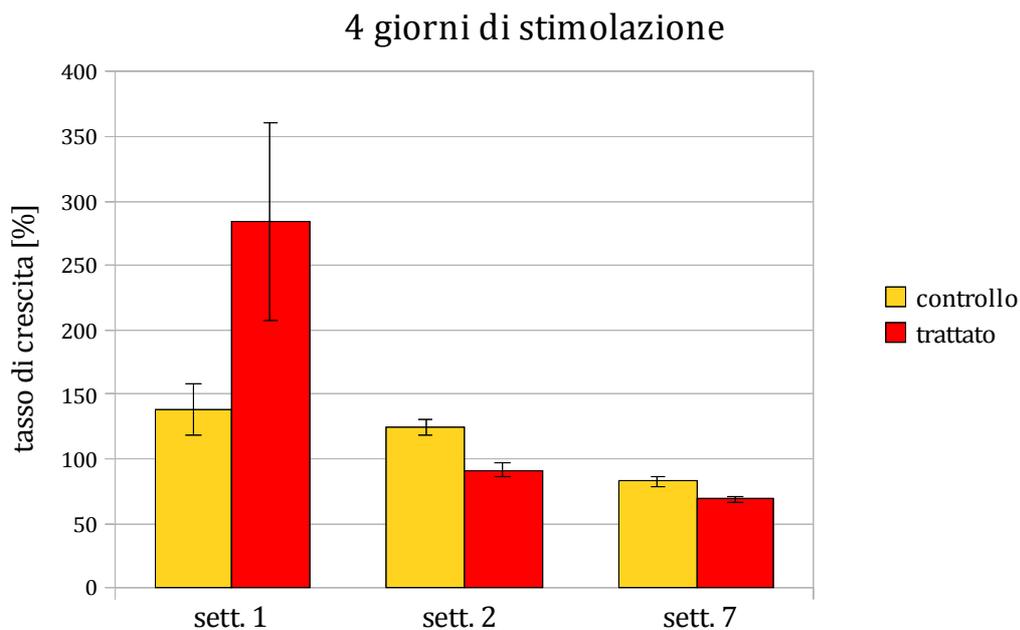
*-(sinistra) Venerdì della prima settimana, campo1, petri C; (destra) Venerdì della seconda settimana, campo1, petri C-*

## 3 RISULTATI

### 3.1 Stimolazione per una settimana

Il numero di prove svolte è pari a 3, corrispondenti alla prima, seconda e settima settimana.

Settimana	1-controllo	1-trattato	2-controllo	2-trattato	7-controllo	7-trattato
<b>T%</b>	138,46	284,42	124,66	91,17	82,57	68,77
<b>SD</b>	164,24	610,63	54,28	45,62	30,12	22,78
<b>SEM</b>	20,53	76,33	6,4	5,38	3,37	2,55



Da notare che i valori di SEM sono ridotti, quindi le misure trovate sono attendibili. L'unica eccezione riguarda il trattato della prima settimana, la cui incertezza più elevata può essere data da una pluralità di fattori tra i quali l'errore umano e l'adattamento delle colture alle nuove condizioni di crescita nelle petri sono probabilmente i più influenti, tuttavia i tassi di crescita di trattato e controllo non sono comparabili, ovvero i relativi intervalli di errore non si sovrappongono, quindi si

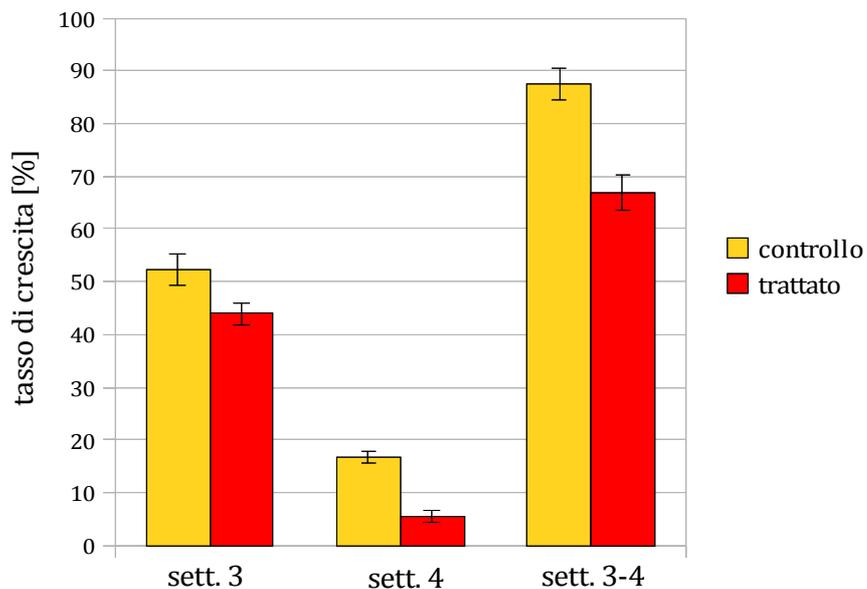
può definire una relazione tra i due, che nel caso di specie vede una maggiore proliferazione degli astrociti trattati. La variazione nei tassi di crescita è pari a (-145,96)% nella prima settimana, a 33,49% nella seconda e a 13,80% nella settimana.

### 3.2 Stimolazione per due settimane

In questo caso sono state fatte due prove, che vedono le settimane 3-4 da una parte e 5-6 dall'altra.

Settimana	3-4 -controllo	3-4 -trattato	5-6 -controllo	5-6 -trattato
$T_{\text{sett1}}\%$	52,36	43,93	95,28	94,86
$T_{\text{sett2}}\%$	16,73	5,69	33,52	18,31
$T\%$	87,47	66,89	246,71	195,21
$SD_{\text{sett1}}$	33,89	22,97	27,62	41,25
$SD_{\text{sett2}}$	12,45	11,19	22,04	17,42
$SD$	33	35,4	79,97	59,03
$SEM_{\text{sett1}}$	3,09	2,1	2,82	4,21
$SEM_{\text{sett2}}$	1,14	1,02	2,25	1,78
$SEM$	3,01	3,23	8,16	6,02

#### 8 giorni di stimolazione

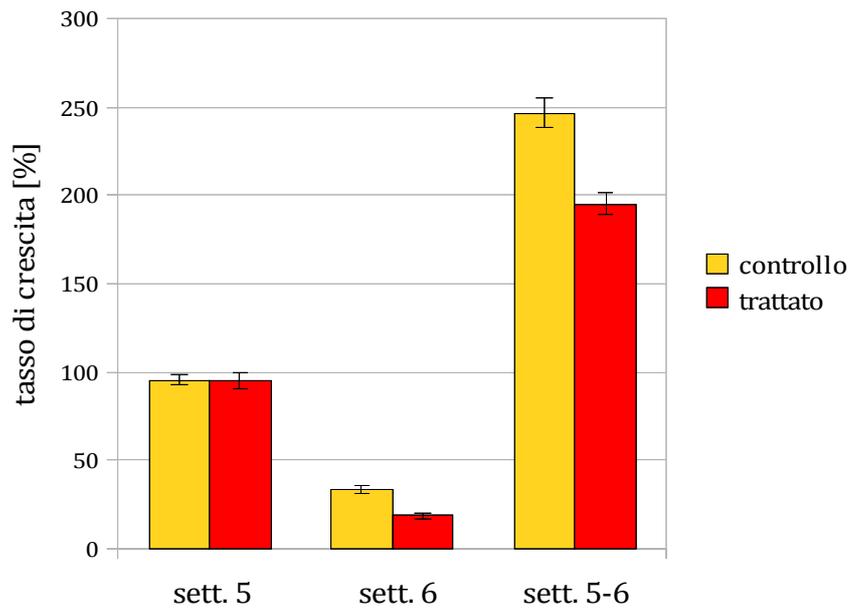


Nella prima coppia di colonne sono rappresentati  $T_{\text{sett1}}\%$  del gruppo di controllo e di trattato, nella seconda ci sono  $T_{\text{sett2}}\%$  e nella terza  $T\%$  con le rispettive SEM. La variazione nella terza settimana è pari a 8,43%, nella quarta è 11,04% e nel complesso (sett. 3-4) è 20,58%.

Per quanto riguarda l'altra coppia di settimane, le tre coppie rappresentano, da sinistra verso destra, i valori di  $T_{\text{sett1}}\%$ , di  $T_{\text{sett2}}\%$  e di  $T\%$ , sempre con annessi intervalli d'incertezza  $[+SEM_i, -SEM_i]$ , dove  $SEM_i$  individua, nei vari casi, la prima settimana, la seconda o le due contemporaneamente. La variazione nei tassi di crescita è del 0,42% nella quinta settimana, del 15,21% nella sesta e del 51,50% nel complesso.

Dall'osservazione di questi due grafici risulta evidente il calo del tasso di crescita dovuto alla senescenza, infatti i valori delle prime due colonne relative al gruppo di controllo, che non dovrebbe essere soggetto ad altri fattori che ne rallentano la crescita, mostrano chiaramente come il valore del tasso nella prima settimana di stimolazione sia maggiore di quello della seconda. Non stupisce che la terza colonna ( $T\%$ ) sia, invece, maggiore delle altre poiché all'inizio della prima settimana le cellule sono rare e quindi meno propense alla divisione, successivamente, quando la loro densità aumenta, si replicano più facilmente e velocemente, fino alla confluenza e successivamente alla degenerazione, sia per l'invecchiamento sia per l'aumento del rapporto anaboliti/cataboliti. Inoltre si nota che la variazione dei tassi di crescita va aumentando con il numero di settimane di stimolazione, ovvero, mentre la differenza tra  $T_{\text{sett1}}\%$  del controllo e  $T_{\text{sett1}}\%$  del trattato è minima, tra i  $T_{\text{sett2}}\%$ , e soprattutto tra i  $T\%$ , è marcata, a riprova del fatto che una stimolazione prolungata rallenta maggiormente la crescita degli astrociti in vitro.

## 8 giorni di stimolazione



## 4 CONCLUSIONI

L'obiettivo dei test svolti è quello di verificare l'influenza del trattamento con il Rexon Age® sul tasso di crescita di colture di astrociti in vitro e si può affermare che la terapia con campi elettromagnetici variabili a radiofrequenza rallenta la crescita di tali cellule. Il fine ultimo dell'intera ricerca è l'utilizzo sull'uomo del Rexon Age® per il trattamento di gliomi.

Anzitutto bisogna considerare che l'identico trattamento subito dalle coppie di petri è servito a ridurre l'influenza di alcuni fattori, che avrebbero potuto falsare il risultato dei test, quali lo stress causato da sbalzi termici, correlati agli spostamenti tra cappa e incubatore, o all'immersione dell'elettrodo nelle petri. Questi stessi fattori, tuttavia, sono presenti in modo nettamente diverso in una situazione in vitro rispetto a una in vivo in cui la temperatura a cui si trovano gli astrociti, ovvero quella interna del corpo, è pressoché costante, fatta eccezione per il lieve aumento derivante dalla stimolazione, e l'elettrodo viene applicato sulla cute in corrispondenza della zona da trattare, ovvero sulla testa, dove sia l'osso sia le meningi costituiscono un notevole filtro nei confronti dei campi elettromagnetici. Nelle petri, inoltre, le cellule devono aderire al substrato di PLL e prepararsi alla replicazione nel breve tempo di tre giorni, problema che non sussiste nel SNC. Se ne deduce, quindi, che i risultati ottenuti nelle prove in vitro possono non essere ripetibili in vivo, proprio a causa di queste diversità tra gli ambienti in cui sono presenti gli astrociti.

Un altro limite è legato alla scelta del numero di cellule da piastrare in ogni petri. Per evitare che gli astrociti giungessero a confluenza prima della fine del trattamento, e formassero quindi un *layer* in cui è difficile, se non impossibile, distinguerli uno ad uno, se ne deve mettere in ogni petri un numero relativamente ridotto, così da evitare il problema dell'inibizione da contatto o la formazione di grappoli di cellule. Tale numero, tuttavia, non può essere eccessivamente basso poiché, per stimolare la replicazione, gli astrociti necessitano dei fattori di crescita, sostanze che loro stessi liberano, quindi, per avere una concentrazione sufficientemente elevata, è

necessaria una discreta quantità di cellule: la densità ottimale rappresenta l'equilibrio tra le condizioni precedenti. Nel corso delle settimane diversi operatori hanno provveduto a preparare i gruppi di petri, quindi la diversa quantità iniziale di astrociti, teoricamente pari a 3000 unità, è un ulteriore fattore che può avere influito negativamente sui risultati ottenuti.

Tralasciando momentaneamente il caso della prima settimana, che verrà discusso in seguito, si nota anzitutto che i risultati ottenuti possono essere ritenuti significativi in quanto gli intervalli d'errore, dati dai valori di SEM, sono contenuti; inoltre il calo nelle stimolazioni prolungate è ben più marcato rispetto ai trattamenti da 4 giorni, sia a livello di seconda settimana consecutiva sia di due settimane assieme, a riconferma del fatto che le cellule risentono, in modo negativo, del campo cui sono sottoposte; infine si vede come, già nelle prime settimane, il tasso di crescita degli stessi controlli cali in conseguenza della senescenza delle cellule che, come è già stato detto, derivano da un unico prelievo a inizio sperimentazione. Per quanto riguarda gli esiti della prima settimana si possono fare varie ipotesi che spieghino la differenza con tutte le prove successive: un errore nell'acquisire le immagini il lunedì e/o il venerdì, dovuto alla familiarizzazione con il dispositivo, porterebbe a una conta cellulare sbagliata e quindi a dei valori errati, così come l'adattamento delle cellule al nuovo ambiente (le petri), che comporta una maggiore mortalità delle prime generazioni, potrebbe corrispondere a un esito positivo nei test.

In base a queste considerazioni si consiglia un nuovo tipo di verifiche il cui obiettivo è quello di verificare se la senescenza è un fattore che influenza l'esito del trattamento, a tal proposito si consiglia l'uso di colture primarie preparate settimanalmente.

Inoltre sarebbe interessante verificare la variazione nei tassi di crescita di colture di astrociti e di glioma, trattate contemporaneamente con le medesime condizioni, come le coppie C-T, così da verificare se il calo nelle cellule tumorali è maggiore o minore di quello delle altre colture: nel primo caso si potrebbe veramente pensare all'utilizzo del Rexion Age® come terapia delle recidive dei tumori cerebrali.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. *Tessuto nervoso.ppt*, <[www.uniroma2.it/didattica/citoistoscibioal](http://www.uniroma2.it/didattica/citoistoscibioal)>
2. (2012), “L’inaspettato potere degli astrociti”, *Le Scienze*, aprile
3. A. Nutini (1999), *Energia e metabolismo cerebrale: la funzione degli astrociti*, ottobre
4. sito: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
5. G.G. Daquino (2001), “Radiazioni non ionizzanti, campi elettromagnetici”, *Seminario di studio in materia di igiene e sicurezza*, 5-7 giugno
6. C. Reggiani, G. Pozzato, A. Cipullo, F.M. Pigozzo, M. Canato, M. Dal Maschio (2009), “Biophysical effects of high frequency electrical field (4-64 MHz) on muscle fibers in culture”, *Basic Applied Myology*, 19(1), pagg. 49-56
7. A. Albanese, E. Battisti, L. Bianciardi, P. Nannotti, N. Giordano, (2008), “Influenza dei campi elettromagnetici ELF e Tammef sulla proliferazione di osteoblasti umani normali “in vitro””, *Europa Medicophysica*, vol.44 suppl. 1 to No. 3, ottobre
8. L.Hardell, C. Sage (2007), “Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 62
9. M. Grandolfo, *Campi elettromagnetici: studi epidemiologici e valutazione del rischio*
10. P. Comba, M. Grandolfo, S. Lagorio, A. Polichetti, P. Vecchia, *Rischio cancerogeno associato a campi magnetici a 50/60 Hz*
11. M. Simkò, M.O. Mattsson (2004), “Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields as Effectors of Cellular Responses In Vitro: Possible Immune Cell Activation”, *Journal of cellular biochemistry*

12. M. Repacholi (2012), "Concern that "EMF" magnetic fields from power lines cause cancer", *Science of total environment*
13. X. Zhang, X. Liu, L. Pan, I. Lee (2010), "Magnetic fields at extremely low-frequency (50 Hz, 0.8 mT) can induce the uptake of intracellular calcium levels in osteoblasts", *Biochemical and biophysical Research Communications*, vol. 396, giugno
14. C. Vedruccio, A. Meessen (2004), "Nuove possibilità diagnostiche tramite onde elettromagnetiche", *Fisica In Medicina AIFM*
15. *La magnetoterapia: effetti e applicazioni terapeutici e biologici*, <<http://www.newageitalia.it/grafica/terapie/magnetobio.pdf>>
16. G. Pozzato, G. Vignato (2003), "Teoria della risonanza quantica molecolare nella realizzazione del bisturi elettronico "VESALIUS"", *Quintessence International*, 5/6
17. C. Reggiani (2005), *Effetti di correnti ad alta frequenza e bassa intensità: bio-stimolazione e rigenerazione cellulare*, aprile
18. G. Pozzato, "Terapia Rexon-Age<sup>®</sup>, per una moderna medicina estetica", *L'ambulatorio medico*
19. T. Vesentini (2007), *I tessuti si possono <<curare>>*, ottobre
20. Telea Electronic Engineering, *Il Rexon-Age: impiego della tecnologia a Risonanza Quantica Molecolare applicata in medicina estetica*
21. sito dell'azienda: [teleamedical.com](http://teleamedical.com)